



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO

LUCAS TALAMINI

Prof^a Dr^a IOLANDA CRUZ VIEIRA

Florianópolis
Julho/2016

Lucas Talamini

DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Florianópolis
Julho/2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ouvir minhas preces e iluminar minha trajetória.

Aos meus pais, Volni e Ivete, por todo seu esforço e dedicação.

À minha orientadora, Profa. Dr^a Iolanda pelo incentivo e auxílio durante todo o trabalho.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Eduardo pelo companheirismo e orientação.

Aos colegas do Laboratório de Biossensores (LaBios), Alessandra, Aline, Larissa, Stephani e Tânia, por toda ajuda fornecida nas dúvidas constantes e pelos momentos de descontração.

À minha namorada, Nicole, por toda compreensão e paciência, sempre ao meu lado mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus fiéis amigos, Lucas Morés, Nicolás, Patrícia, Thiago, Marco, Beatriz, Sheila, Marcos, Joseane, Ana Maria, Lucas Murara, Schayana, Caio, Alechania, Germano, Lucas Mayr, Pedro, Diovani, Felipe Maciel, Eduardo, Gustavo e João.

Ao laboratório do Prof. Dr. Hugo Gallardo pela síntese do cristal líquido Br-Py.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME-UFSC) pelas medidas de microscopia.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ao Departamento de Química e a todos os professores que contribuíram para minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de iniciação científica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo apoio financeiro.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1. Biossensor	11
2.2. Imunossensor	11
2.3. Antígeno prostático específico (PSA).....	12
2.4. Nanopartículas de ouro.....	14
2.5. Cristal líquido.....	14
2.6. Técnicas voltamétricas	15
2.6.1. Voltametria de onda quadrada.....	16
3. OBJETIVO GERAL.....	17
3.1. Objetivos específicos	17
4. METODOLOGIA	17
4.1. Reagentes e soluções	17
4.2. Equipamentos	19
4.3. Construção do imunossensor	19
4.4. Construção da curva de calibração	19
4.5. Estudo dos possíveis interferentes	20
4.6. Determinação de PSA em plasma simulado	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1. Caracterização das AuNP-Hep	21
5.2. Estudo da contribuição dos modificadores utilizados na construção do imunossensor	21
5.3. Princípio de funcionamento do imunossensor proposto	22
5.4. Otimização do método	23
5.4.1. Estudo do tempo de imobilização do anticorpo e tempo de incubação do antígeno.....	23
5.4.2 Estudo dos parâmetros da SWV.....	24

5.5. Desempenho analítico do imunossensor proposto.....	25
5.5.1. Curva de calibração para PSA.....	25
5.5.2. Estudo dos possíveis interferentes	26
5.5.3. Determinação de PSA em amostras de plasma simulado	27
6. CONCLUSÃO.....	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Princípio de funcionamento de imunossensores com marcação de anticorpo (A) e sem marcação de anticorpo (B).	12
Figura 2. Ilustração da formação de um imunocomplexo na superfície do eletrodo.	13
Figura 3. (A) Forma de aplicação do potencial na SWV. (B) Representação do voltamograma da SWV.	16
Figura 4. Imagem de TEM para AuNP-Hep. Inserido: histograma referente a aproximadamente 250 partículas.	21
Figura 5. Resposta voltamétrica obtida para cada modificador utilizado na construção do imunossensor utilizando a técnica de SWV em PBS (0,01 mol L ⁻¹ , pH 7,4).	22
Figura 6. Representação esquemática do princípio de funcionamento do imunossensor proposto.	23
Figura 7. Estudo do tempo de incubação do antígeno (10 – 40 min).	24
Figura 8. Estudo do efeito dos parâmetros de SWV sobre a resposta analítica do imunossensor: (A) frequência (10 – 100 Hz); (B) amplitude (10 – 100 mV); (C) incremento (1 – 10 mV).	25
Figura 9. Voltamogramas e curva de calibração empregando o imunoossensor proposto para diferentes concentrações de PSA em tampão PBS (0,01 mol L ⁻¹ , pH 7,4).	26
Figura 10. Estudo dos possíveis interferentes na resposta do imunossensor..	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Determinação de PSA em plasma simulado.	27
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AuE – Eletrodo de ouro

AuNP-Hep – Nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina

CL – Cristal Líquido

Br-Py – (brometo de (E)-1-decil-4-((4-(deciloxi)fenil)diazenil)piridínio)

Ab-PSA – Anticorpo para o antígeno prostático específico

PSA – Antígeno prostático específico (do inglês, *Prostate-Specific Antigen*)

PBS – Tampão fosfato salino

Ag/AgCl – Eletrodo de referência de prata/cloreto de prata

SWV – Voltametria de onda quadrada (do inglês, *Square Wave Voltammetry*)

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês, *Transmission Electron Microscopy*)

RESUMO

O antígeno prostático específico (*Prostate-Specific Antigen* - PSA), produzido pelas glândulas prostáticas, está presente principalmente no sêmen e em pequena quantidade também no sangue. Este antígeno atua como um possível indicador do câncer de próstata (CP), já que sua concentração no sangue está associada à presença da doença. Dentre as metodologias alternativas para detecção de CP, destaca-se a construção de novos imunossensores para determinação de PSA, os quais podem contribuir para o diagnóstico precoce do CP de uma maneira rápida e menos invasiva para o paciente. Por esta razão, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo imunossensor eletroquímico *label-free* para detecção de PSA, utilizando um eletrodo de ouro contendo filme de cristal líquido (brometo de (E)-1-decil-4-((4-(deciloxi)fenil)diazenil)piridínio) como sonda redox, nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina (AuNP-Hep) para imobilização do anticorpo (Ab-PSA) e Nafion[®] para fixação do filme na superfície do sensor. O imunossensor proposto foi otimizado utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada, e as melhores condições experimentais obtidas foram: frequência de 50,0 Hz, amplitude de 60,0 mV, incremento de 5,0 mV, solução tampão fosfato salino (0,01 mol L⁻¹, pH 7,4), tempo de imobilização de 30 min para o anticorpo e tempo de incubação de 30 min para o antígeno (amostra). Foi construída uma curva de calibração relacionando a supressão da corrente (SC) da sonda redox em função da concentração de PSA. A curva de calibração nas melhores condições de trabalho apresentou uma faixa linear de 1 a 5 ng mL⁻¹ de PSA, a equação da regressão linear foi de: $SC = 22,17 (\pm 1,43) + 11,51 (\pm 0,46) [PSA]$, coeficiente de correlação (R^2) de 0,994 e limite de detecção de 0,37 ng mL⁻¹. O imunossensor proposto foi utilizado com sucesso na determinação de PSA em amostras simuladas de plasma sanguíneo a partir da supressão do sinal da sonda de cristal líquido, acompanhada por voltametria de onda quadrada. Além disso, conclui-se que o imunossensor proposto demonstrou uma boa sensibilidade à concentração do antígeno na faixa necessária para detecção da doença, podendo auxiliar no diagnóstico precoce do CP.

Palavras-chave: imunossensor, cristal líquido, nanopartícula de ouro, câncer de próstata.

INTRODUÇÃO

Os métodos eletroanalíticos têm sido cada vez mais utilizados para determinação de diversas substâncias devido ao curto tempo necessário para análise, baixos limites de detecção e baixo custo dos equipamentos.

Quando o aumento da sensibilidade do método proposto for desejado, a superfície do eletrodo de trabalho deve ser modificada com diferentes materiais, podendo ser eles: enzimas, anticorpos, polímeros, nanomateriais, dentre outros.

Quando um anticorpo é imobilizado na superfície do eletrodo de trabalho, o biossensor construído será específico para um determinado antígeno. Este biossensor também é denominado de imunossensor.

O uso de modificadores (ex: nanomateriais) em conjunto com o anticorpo é comumente usado, pois contribui para o aumento da resposta do biossensor e auxilia na diminuição do limite de detecção. Dentre esses materiais, as nanopartículas metálicas vêm sendo amplamente usadas devido as suas propriedades ópticas, eletrônicas e magnéticas.

O câncer encontra-se entre as doenças de maior interesse quanto a sua detecção e cura. Métodos que sejam eficazes na detecção precoce, ou seja, no estágio inicial, têm sido de grande interesse, pois podem colaborar para o sucesso do tratamento. Portanto, com o objetivo de contribuir com o diagnóstico precoce e principalmente para a saúde humana, neste trabalho foi construído um imunossensor usando o anticorpo ab-PSA para detecção do antígeno prostático específico (PSA) no sangue. As nanopartículas de ouro foram usadas devido a sua capacidade de imobilizar materiais biológicos, como anticorpos, em sua superfície através de interações eletrostáticas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Biossensor

Grande parte das análises químicas é realizada por profissionais especializados em laboratórios empregando instrumentos específicos, assegurando assim a maior confiança possível nos resultados obtidos. Contudo, existem muitos casos em que a análise clínica não pode ser realizada em condições ideais devido à falta de analistas treinados ou equipamentos necessários. Nestes casos, os biossensores, que são dispositivos analíticos para a detecção de analitos específicos, podem ser uma opção para fazer um diagnóstico confiável.¹

Um biossensor pode ser definido como um sensor que utiliza um material biológico (enzimas, anticorpos, antígenos, organismos, tecido animal e vegetal, células, organelas, etc.) conectado a um transdutor (qualquer dispositivo capaz de transformar um tipo de sinal em outro) o qual converte um sinal biológico em sinal elétrico. A reação de interesse é monitorada, quando o material biológico é imobilizado em um suporte adequado.²

Na construção de um biossensor são utilizados vários materiais com a finalidade de contribuir na imobilização do material biológico, reduzindo o tempo de resposta, aumentando a estabilidade e a sensibilidade, bem como possibilitando a obtenção de limites de detecção cada vez menores.³

2.2. Imunossensores

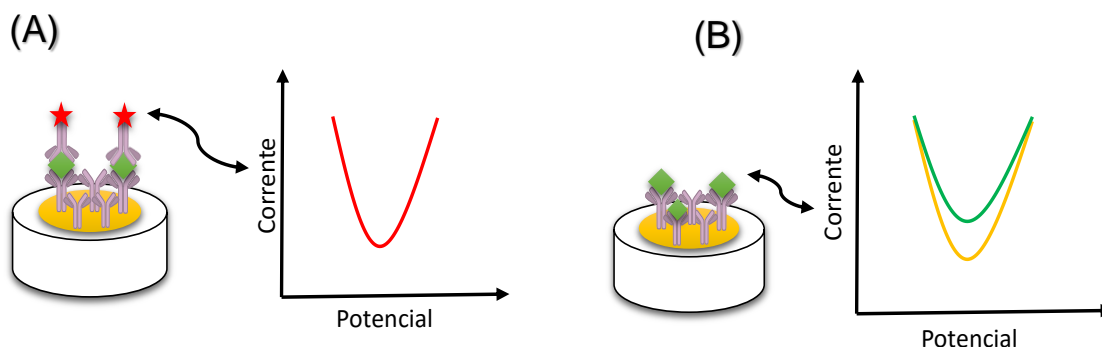
O imunossensor é um tipo de biossensor baseado na formação de um imunocomplexo, sendo que o antígeno ou anticorpo é imobilizado na superfície do transdutor. Ao imobilizarmos um anticorpo na superfície do eletrodo, quando em contato com seu antígeno específico eles ligam-se formando um imunocomplexo (ligação anticorpo-antígeno). Dentre os imunossensores podemos citar dois modelos, os imunossensores eletroquímicos com marcação do anticorpo e sem marcação.⁴

Em sistemas que utilizam anticorpo com marcação, é avaliado o sinal gerado pela sonda redox ligada ao anticorpo marcado após ele ligar-se ao

antígeno que já está complexado com o anticorpo imobilizado na superfície do sensor. Neste caso, quanto maior for o número de moléculas de antígeno ligadas aos anticorpos imobilizados na superfície do sensor, maior será o sinal obtido.⁵ O princípio de funcionamento de imunossensores que utilizam anticorpo com marcação está ilustrado na Figura 1 (A).

Em sistemas que utilizam anticorpo sem marcação (*label-free*) é necessário o uso de uma sonda redox (espécie eletroquimicamente ativa) pois tanto o antígeno quanto o anticorpo são proteínas, ou seja, são eletroquimicamente inertes. Esta sonda redox pode estar presente em solução junto ao eletrólito de suporte ou diretamente na superfície do sensor. Neste modelo de imunossensores, a formação do imunocomplexo será acompanhada com a medida da supressão da corrente devido ao bloqueio parcial da superfície eletroativa do sensor.⁶ O princípio de funcionamento de imunossensores que utilizam anticorpo sem marcação está ilustrado na Figura 1 (B).

Figura 1. Princípio de funcionamento de imunossensores com marcação de anticorpo (A) e sem marcação de anticorpo (B).



2.3. Antígeno prostático específico (PSA)

O antígeno prostático específico (PSA) é uma serina protease relacionada com a calicreína (grupo de proteases codificadas em uma família de genes), que é produzida na sua maioria por células epiteliais da próstata. Sua utilização como um biomarcador do câncer de próstata foi postulado na década de 1970, quando foi isolado a partir de tecidos prostáticos normais,

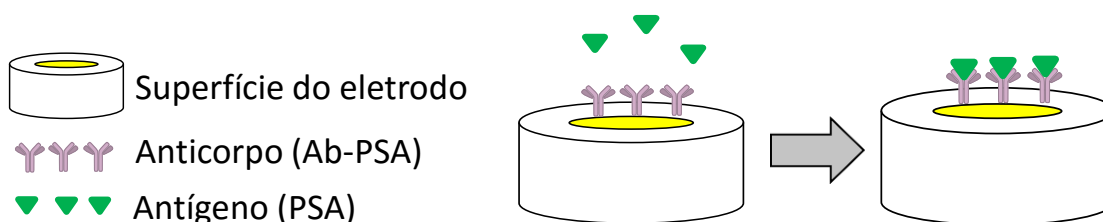
com tumores benignos e com tumores malignos. A detecção precoce do câncer de próstata é muito importante pois a doença geralmente não apresenta sinais de evolução em seu estágio inicial. A concentração considerada normal de PSA no sangue é de até 4 ng mL^{-1} .⁷⁻⁹

Grande parte dos homens com câncer de próstata apresentavam metástases, ou seja, uma nova lesão tumoral era formada a partir do câncer de próstata. A utilização do PSA como um biomarcador resultou em um aumento da detecção da doença em seu estado inicial, aumentando as chances de cura e evitando metástases.¹⁰

A detecção precoce do câncer de próstata é feita através da análise da concentração de PSA no sangue. Técnicas que constatarem com precisão a concentração de PSA têm sido extensivamente investigadas para a detecção precoce da doença. Técnicas eletroquímicas são úteis para a detecção de proteínas, medindo a alteração da resposta de corrente e impedância em tempo real. A sensibilidade e a especificidade do biossensor eletroquímico depende principalmente do suporte e da eficiente imobilização das proteínas.¹¹

Existem várias estratégias para imobilização do anticorpo na superfície de um eletrodo, que é geralmente o primeiro passo para a formação do imunocomplexo desejado. O reconhecimento molecular do antígeno pelo anticorpo imobilizado no eletrodo faz com que ocorra mudanças interfaciais, tal como corrente, capacitância, resistência, dentre outras.¹² A Figura 2 ilustra a etapa em que o antígeno liga-se ao anticorpo imobilizado na superfície do eletrodo, formando o imunocomplexo.

Figura 2. Ilustração da formação de um imunocomplexo na superfície do eletrodo.



Para que o anticorpo permaneça imobilizado na superfície do eletrodo, alguns materiais podem ser utilizados, tais como as nanopartículas de ouro. A presença de nanopartículas proporciona um microambiente biocompatível para

as biomoléculas, proporcionando um grande aumento na taxa de imobilização dos anticorpos, e com isso, aumentando a sensibilidade do sistema.¹³

2.4. Nanopartículas de ouro

Nanomateriais, tais como nanopartículas metálicas têm sido amplamente utilizados em sensores eletroquímicos e biossensores. As nanopartículas podem desempenhar diferentes funções em biossensores, como imobilização de biomoléculas, catálise de reações eletroquímicas, aumento da transferência de elétrons, dentre outras.¹⁴

O ouro é considerado o elemento químico que apresenta a maior inércia frente às agressões de natureza corrosiva. Devido a esta propriedade, o metal exibe um amplo espectro de aplicações e excelente atividade catalítica quando preparado através de técnicas específicas que possibilitam a obtenção de partículas com dimensões miniaturizadas. As particularidades das nanopartículas de ouro têm estimulado áreas distintas de pesquisas nos últimos anos. A exploração das propriedades ópticas, eletrônicas e magnéticas destes materiais tem permitido seu emprego em diferentes campos de aplicação, tais como na construção de biossensores, em sistema de liberação de fármacos, lubrificantes, células solares, catálise, dentre outros.¹⁵

Para que a suspensão coloidal de nanopartículas seja estável, faz-se necessário o uso de espécies denominadas estabilizantes (ex: proteínas, polímeros), pois a grande energia superficial das nanopartículas favorece termodinamicamente sua agregação para formação de ligações metal-metal. Os estabilizantes se adsorvem sobre a superfície das nanopartículas formando uma camada auto-organizada que impede a coalescência do material.¹⁶

2.5. Cristal líquido

Cristais líquidos (CL) são substâncias que combinam propriedades do estado líquido, como a fluidez, com propriedades do estado sólido, onde suas moléculas ficam em um arranjo moderadamente ordenado, semelhante à de

um cristal. Esses materiais podem gerar resultados interessantes, tais como o aumento da sensibilidade quando usados na construção de sensores.¹⁷

Além disso, como reportado por Zapp *et al.*, 2014, os CL podem atuar como transdutores nas interações químico-biológicas e interações ligante-receptor, que ocorrem na formação de imunocomplexos. Moléculas de CL foram usadas com sucesso na construção de imunossensores que empregam as interações ligante-receptor que ocorrem na formação de imunocomplexos envolvendo proteínas cardíacas.¹⁸

2.6. Técnicas voltamétricas

Os métodos eletroanalíticos que dependem da medida da corrente, em função do potencial aplicado, são chamados métodos voltamétricos. Esses métodos empregam condições que favorecem a polarização do eletrodo de trabalho. Geralmente, para aumentar a polarização, os eletrodos de trabalho utilizados nas técnicas voltamétricas são relativamente pequenos, com áreas superficiais de alguns milímetros quadrados, no máximo e, em algumas aplicações, apenas alguns micrômetros quadrados. As técnicas voltamétricas baseiam-se na medida da corrente em uma célula eletroquímica sob condições de completa polarização de concentração, na qual a velocidade de oxidação ou redução do analito é limitada pela velocidade de transferência de massa do analito para a superfície do eletrodo.¹⁹

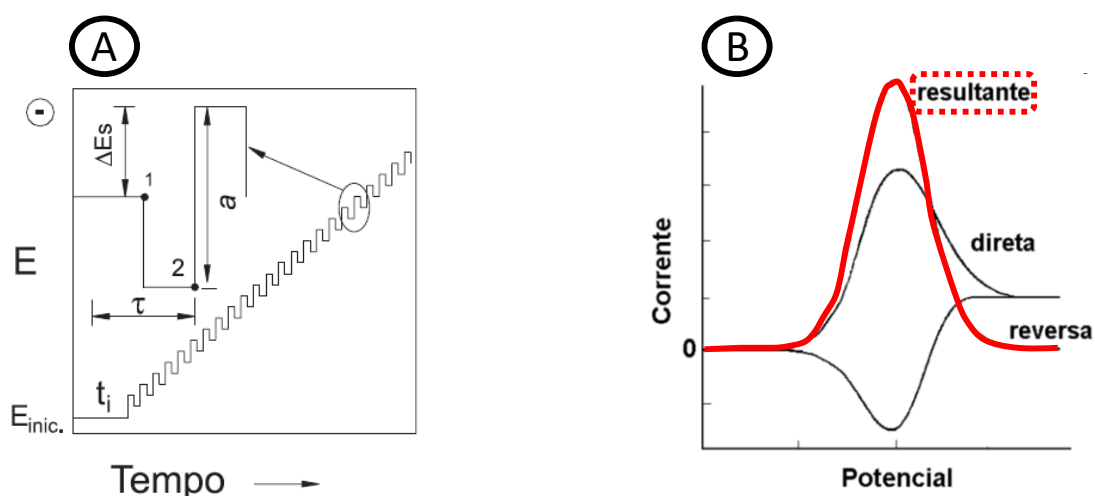
O curto tempo na realização das análises, o baixo custo da instrumentação e dos materiais utilizados, se comparados às técnicas cromatográficas e espectrométricas fazem com que as técnicas eletroanalíticas sejam utilizadas cada vez mais. Sua crescente importância levou ao desenvolvimento de técnicas cada vez mais sensíveis às espécies em estudo, algumas inclusive com limites de detecção tão baixos que já podem ser comparados aos das técnicas tradicionais, como as cromatográficas, utilizadas na análise de compostos orgânicos e inorgânicos em matrizes ambientais, biológicas e em alimentos.^{20,21}

2.6.1. Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (do inglês, *square wave voltammetry* – SWV) é uma técnica voltamétrica de pulso onde a forma do pico de corrente resultante é proveniente da sobreposição de pulsos de potencial de altura a (amplitude de pulsos), a uma escada de potenciais de largura ΔE_s (incremento de varredura de potenciais) e duração $2t$ (período). Atualmente, a SWV é uma das técnicas de pulso mais rápidas e sensíveis, apresentando limites de detecção da ordem de 1 ng L^{-1} . A forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada está ilustrada na Figura 3 (A).²⁰⁻²²

A medição da corrente é obtida ao final de cada pulso de potencial, sendo um pulso no sentido da oxidação (direto) e outro no sentido da redução (reverso). Devido ao fato da corrente ser medida ao final de cada pulso, há uma grande diminuição da contribuição da corrente capacitiva (não faradaica) pois ela decai mais rapidamente em relação a corrente faradaica. O voltamograma resultante será a diferença entre as correntes medidas ao final do pulso direto e ao final do pulso reverso, porém como a corrente do pulso reverso é negativa, o sinal resultante será uma soma dessas duas correntes *versus* o potencial aplicado. A representação do voltamograma da SWV está ilustrada na Figura 3 (B).^{21,22}

Figura 3. (A) Forma de aplicação do potencial na SWV. (B) Representação do voltamograma da SWV.



3. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um imunossensor para detecção de antígeno prostático específico (PSA) em plasma sanguíneo utilizando cristal líquido como sonda redox, nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina para fixação do anticorpo (Ab-PSA) e Nafion[®] para fixação do filme no eletrodo.

3.1. Objetivos específicos

- Sintetizar as nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina;
- Otimizar o tempo de imobilização para o anticorpo (Ab-PSA) e o tempo de incubação para o antígeno (PSA);
- Otimizar os parâmetros da técnica voltamétrica de onda quadrada;
- Investigar os possíveis compostos interferentes para a determinação de PSA;
- Determinar PSA em amostras de plasma simulado e comparar os resultados com a solução padrão de PSA.

4. METODOLOGIA

4.1. Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico e por este motivo não passaram por processos de purificação. As soluções utilizadas durante o trabalho foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q[®], resistividade abaixo de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) para evitar erros por possíveis contaminantes.

A preparação do eletrólito de suporte, o tampão fosfato salino (PBS) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4), foi feita da seguinte maneira: foram dissolvidos 8,00 g de NaCl, 0,200 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 e 0,240 g de KH_2PO_4 em 800,0 mL de água ultrapura e após completa dissolução, o volume final da solução foi completado para 1 L.

A solução de cristal líquido (brometo de (E)-1-decil-4-((4-(deciloxi)fenil)diazenil)piridínio) foi preparada na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diclorometano (Nuclear).

As soluções estoque de 1000 ng mL^{-1} do anticorpo Ab-PSA e solução estoque do antígeno (PSA) (Sigma-Aldrich) foram preparadas em solução de PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4). Para ser utilizada nos testes de detecção do imunossensor, a solução estoque de antígeno foi diluída para valores de 1 a 5 ng mL^{-1} .

A solução de Nafion[®] (Sigma-Aldrich) foi preparada na concentração de $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ em água ultrapura.

As soluções dos possíveis interferentes testados foram preparadas em suas respectivas concentrações em PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4). Os interferentes (Sigma-Aldrich) testados foram: glicose (200 mg L^{-1}), albumina de soro bovino (40 mg L^{-1}), ácido úrico (10 mg L^{-1}), creatinina ($4,2 \text{ mg L}^{-1}$), ácido ascórbico (10 mg L^{-1}) e creatina (10 mg L^{-1}).

A solução de plasma simulado foi preparada utilizando todos os possíveis interferentes estudados em suas respectivas concentrações em uma mesma solução contendo uma concentração conhecida de PSA em PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4).

A síntese das AuNP estabilizadas em heparina foi feita da seguinte maneira: $100 \mu\text{L}$ de uma solução padrão de cloreto de ouro (III) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram transferidas para 10 mL de uma solução 0,5% (m/v) de heparina. Após a homogeneização, $200 \mu\text{L}$ de uma solução de borohidreto de sódio (20 mmol L^{-1} em água Milli-Q[®] gelada) foram adicionadas na solução de heparina sob agitação para redução do ouro. Ocorreu uma mudança de cor perceptível instantaneamente à adição do borohidreto, partindo de um amarelo claro para o vermelho vinho característico das nanopartículas de ouro. O sistema foi mantido sob agitação durante 30 min. A solução final de AuNP-Hep foi transferida para tubos Eppendorf[®] e centrifugada por 15 min a 4°C e a 10000 rpm . Após a centrifugação o material sobrenadante foi removido e o precipitado foi diluído em água ultrapura na proporção 1:1, sendo em seguida utilizado na montagem do imunossensor.

4.2. Equipamentos

As análises voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 128N, com auxílio de uma célula eletroquímica, utilizando PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) como eletrólito de suporte, e um sistema de três eletrodos foi utilizado nas medidas: eletrodo de referência (Ag/AgCl, KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$), eletrodo auxiliar (placa de platina) e eletrodo de trabalho (imunossensor).

4.3. Construção do imunossensor

O imunossensor foi construído a partir das seguintes etapas: $2 \mu\text{L}$ de CL foram depositados na superfície do eletrodo de ouro e após a secagem, $2 \mu\text{L}$ da solução de AuNP-Hep foram depositados e mantido no dessecador durante 10 min. Após a secagem do material, foi feita uma lavagem da superfície modificada com PBS para remoção do material fracamente adsorvido. Em seguida, $2 \mu\text{L}$ da solução de Ab-PSA foram depositados, incubado por 30 min, lavado novamente com PBS e finalmente, $2 \mu\text{L}$ da solução de Nafion[®] $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ foram depositados. O imunossensor foi transferido para o dessecador por 10 min e após a secagem foi usado como eletrodo de trabalho.

4.4. Construção da curva de calibração

Para construção da curva de calibração do antígeno prostático específico (PSA), as medidas de corrente utilizando o imunossensor proposto foram obtidas da seguinte forma: inicialmente, um pico base foi obtido e utilizado como referência para análise da supressão da resposta. Em seguida, concentrações crescentes de PSA ($1,0$, $2,0$, $3,0$, $4,0$ e $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$) foram depositadas na superfície do eletrodo, incubada durante 30 min, lavado com solução de PBS e realizadas as medidas voltamétricas para obtenção das correntes. A formação do imunocomplexo do Ab-PSA+PSA ocasiona uma supressão da resposta voltamétrica que está relacionada com a concentração de PSA adicionada à superfície do sensor.

Com os valores de supressão obtidos, foi construído um gráfico relacionando a supressão da corrente do pico base com a concentração de PSA adicionada.

4.5. Estudo dos possíveis interferentes

Para que a determinação da concentração de PSA no sangue seja quantificada de forma precisa, o estudo dos possíveis interferentes presentes neste material biológico foi realizado. As substâncias presentes no sangue e que foram estudadas são: glicose (200 mg L^{-1}), albumina de soro bovino (40 mg L^{-1}), ácido úrico (10 mg L^{-1}), creatinina ($4,2 \text{ mg L}^{-1}$), ácido ascórbico (10 mg L^{-1}) e creatina ($10,7 \text{ mg L}^{-1}$).

A avaliação da resposta do imunossensor contendo os possíveis interferentes foi realizada utilizando $2 \mu\text{L}$ das soluções acima mencionadas em substituição ao antígeno (PSA) e nas mesmas concentrações encontradas no sangue. Após os 30 min de incubação, foi feita a medição da corrente e o pico obtido será comparado ao pico base. Caso ocorra alguma interferência, o pico poderá aumentar (interferência positiva) ou diminuir (interferência negativa). O ideal é que essas substâncias não interfiram na resposta do imunossensor e consequentemente na determinação de PSA nas amostras de plasma.

4.6. Determinação de PSA em plasma simulado

Este teste foi realizado utilizando soluções de plasma simulado com diferentes concentrações de PSA na etapa de adição do antígeno. Com os resultados obtidos será possível avaliar a capacidade do imunossensor proposto em ser utilizado na detecção de PSA em amostras biológicas reais.

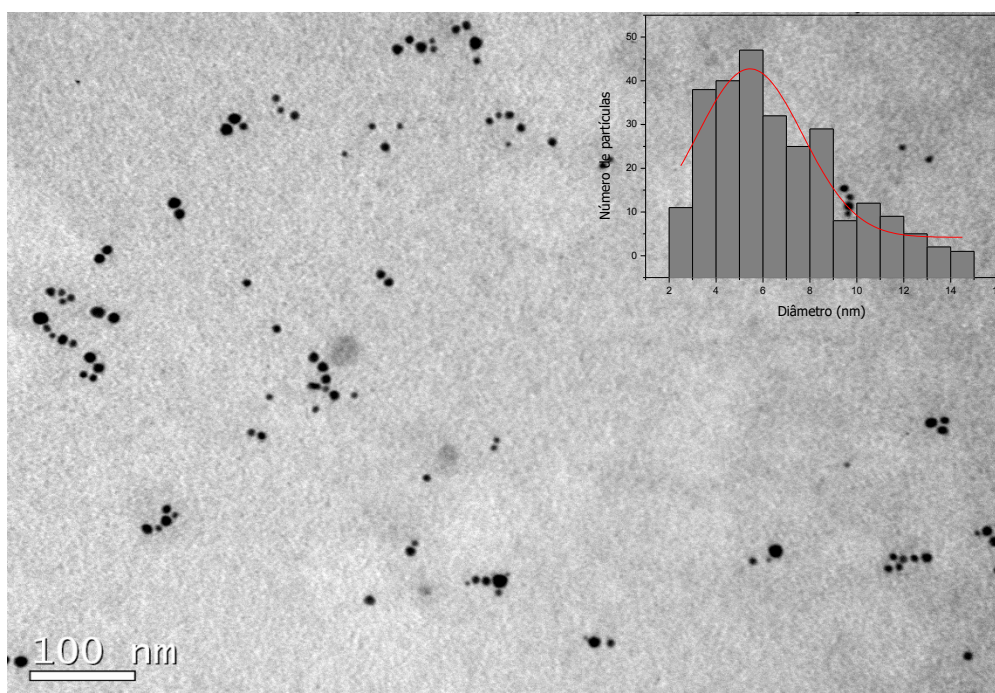
5. Resultados e discussão

5.1. Caracterização das AuNP-Hep

Para que o tamanho nanométrico das partículas fosse mantido, sua síntese foi realizada em uma solução 0,5% de heparina que serviu como estabilizante evitando sua coalescência.

O tamanho médio das AuNP-Hep foi avaliado com o auxílio da técnica de microscopia de transmissão eletrônica (TEM). As AuNP-Hep apresentaram um diâmetro médio de $5,45 \pm 2,25$ nm como está ilustrado na Figura 4.

Figura 4. Imagem de TEM para AuNP-Hep. Inserido: histograma referente a aproximadamente 250 partículas.

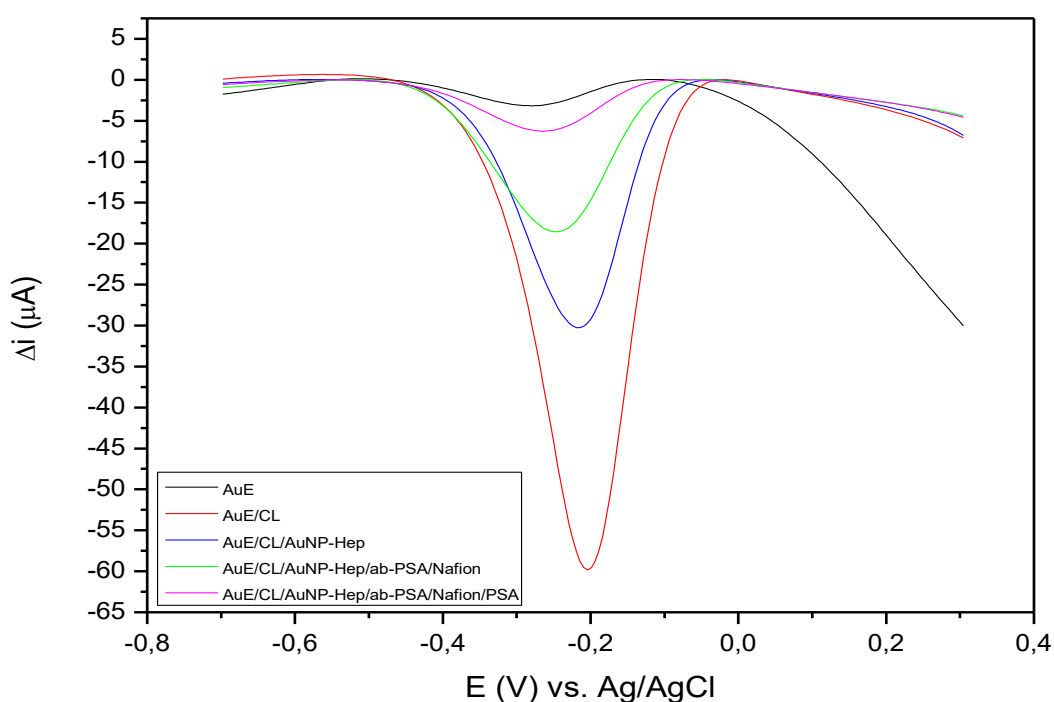


5.2. Estudo da contribuição dos modificadores utilizados na construção do imunossensor

As diferentes etapas de construção do imunossensor foram avaliadas de acordo com a resposta voltamétrica obtida. Apenas o eletrodo de ouro limpo (AuE) apresentou uma baixa resposta. O eletrodo contendo cristal líquido (CL) apresentou uma alta resposta pois ele é a sonda redox do imunossensor. Após as AuNP-Hep serem adicionadas houve uma diminuição na resposta devido a

presença da heparina, que por não conduzir corrente bloqueia parcialmente a superfície ativa do eletrodo. O mesmo ocorre na etapa em que o anticorpo é adicionado juntamente com o Nafion® (Ab-PSA/Nafion), pois como o anticorpo é uma proteína, ele também não irá conduzir corrente por não ser eletroquimicamente ativo e com isso bloqueará parcialmente a superfície ativa do imunossensor. Por último, com a adição do antígeno (PSA) a resposta irá diminuir novamente devido ao fato do antígeno ser uma proteína como o anticorpo. A Figura 5 ilustra a resposta voltamétrica obtida para cada etapa de construção do imunossensor quando utilizada a técnica de SWV em PBS (0,01 mol L⁻¹, pH 7,4).

Figura 5. Resposta voltamétrica obtida para cada modificador utilizado na construção do imunossensor utilizando a técnica de SWV em PBS (0,01 mol L⁻¹, pH 7,4).

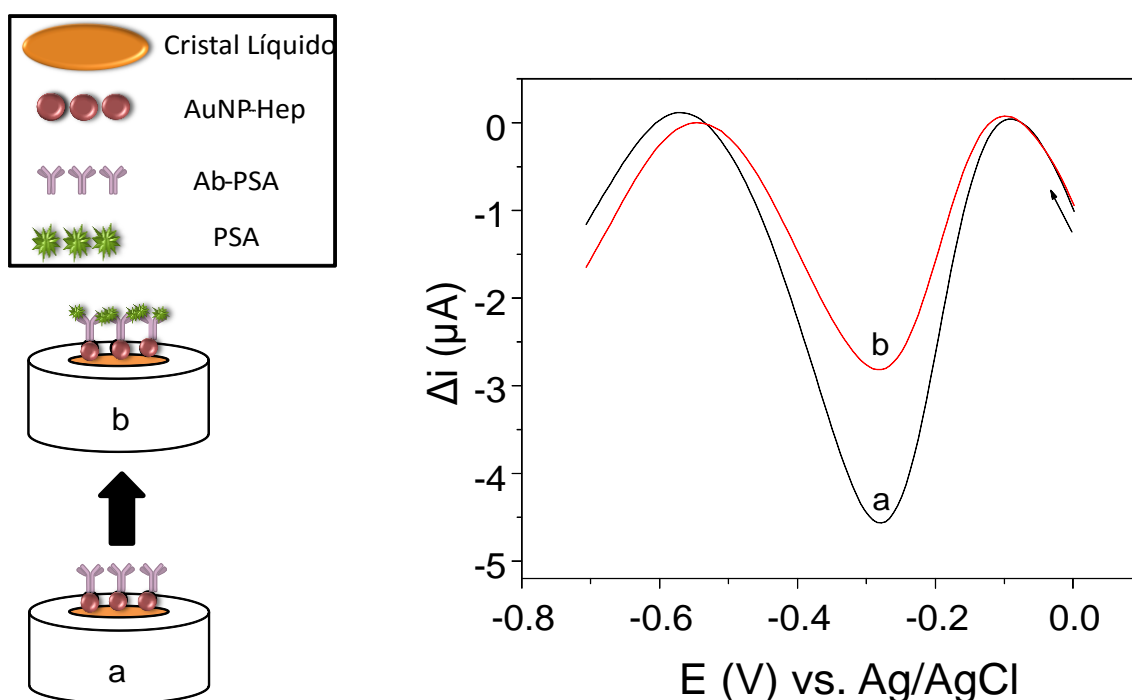


5.3. Princípio de funcionamento do imunossensor proposto

Por se tratar de um imunossensor sem marcação de anticorpo (*label-free*), foi avaliada a supressão da corrente devido a formação do imunocomplexo. Foi realizada a medida de corrente do imunossensor contendo todos os modificadores até o Ab-PSA+Nafion, esta corrente é referente ao pico

base. Após a adição do antígeno foi feita novamente a medida da corrente para que fosse possível relacionar a concentração de antígeno presente com a supressão da corrente. O princípio de funcionamento do imunossensor está esquematizado na Figura 6.

Figura 6. Representação esquemática do princípio de funcionamento do imunossensor proposto.



5.4. Otimização do método

Foram investigados parâmetros tais como o tempo de imobilização do anticorpo, tempo de incubação do antígeno e parâmetros da técnica de SWV (frequência, amplitude e incremento).

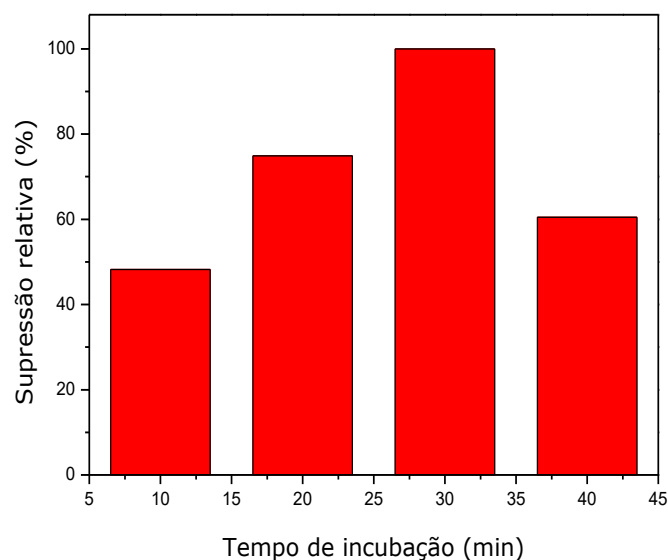
5.4.1 Estudo do tempo de imobilização do anticorpo e tempo de incubação do antígeno

Devido ao fato do anticorpo estar ligado às AuNP-Hep eletrostaticamente, a taxa de imobilização observada não apresentou um comportamento constante. Devido a isso o tempo de imobilização de 30 min foi

escolhido pois garantia que a maior quantidade possível de anticorpos presentes estavam imobilizados nas AuNP-Hep.

Já o tempo de incubação do antígeno apresentou uma maior resposta em 30 min, como está ilustrado na Figura 7. Este parâmetro foi avaliado relacionando a maior supressão obtida utilizando a mesma concentração de PSA adicionado porém variando o tempo de incubação (10 – 40 min).

Figura 7. Estudo do tempo de incubação do antígeno (10 – 40 min).



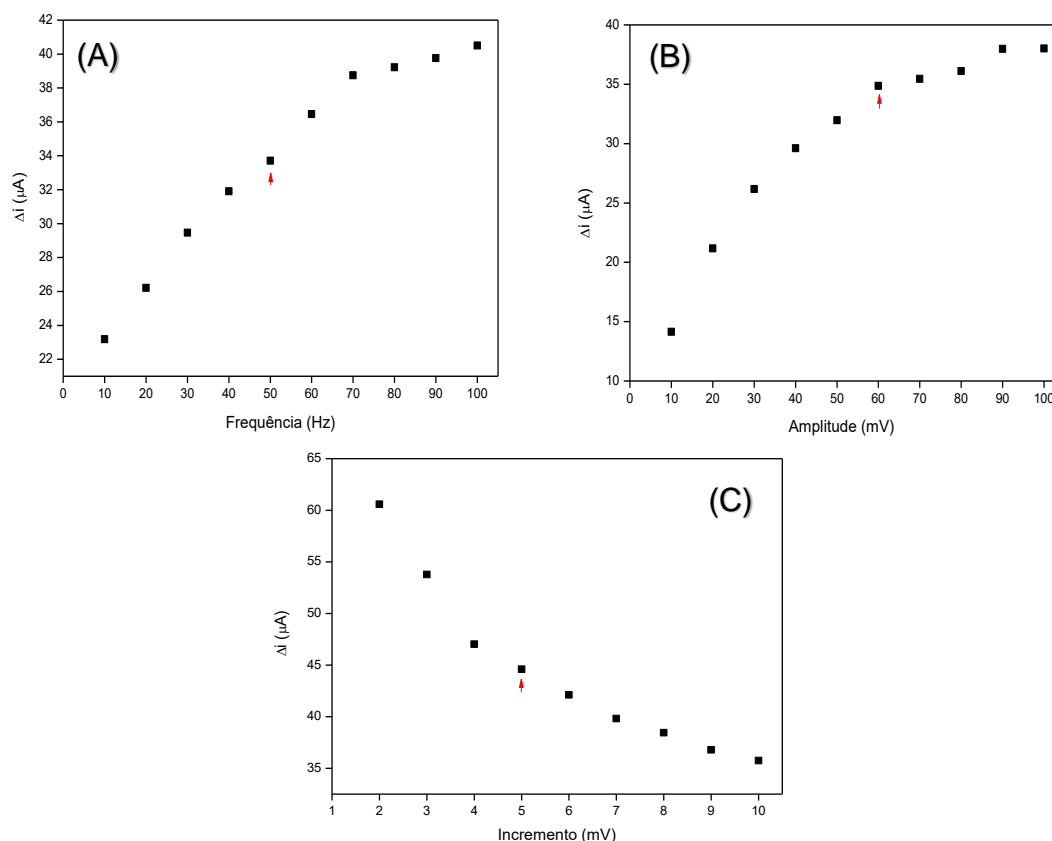
5.4.2 Estudo dos parâmetros da SWV

Os parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada foram estudados afim de proporcionar um pico de corrente bem definido e intenso. Para isto, o eletrodo contendo a sonda redox Br-Py foi construído e utilizado no estudo.

Os parâmetros estudados foram a amplitude, frequência e incremento. O estudo foi feito fixando dois parâmetros e variando o terceiro. As correntes de pico obtidas para cada variação foram plotadas vs o potencial aplicado e o melhor valor foi selecionado para o trabalho.

Os parâmetros selecionados após a otimização foram: frequência de 50 Hz, amplitude de 60 mV e incremento de 5 mV . A Figura 8 ilustra a corrente de pico vs o potencial aplicado para cada parâmetro estudado.

Figura 8. Estudo do efeito dos parâmetros de SWV sobre a resposta analítica do imunossensor: (A) frequência (10 – 100 Hz); (B) amplitude (10 – 100 mV); (C) incremento (2 – 10 mV).



5.5. Desempenho analítico do imunossensor proposto

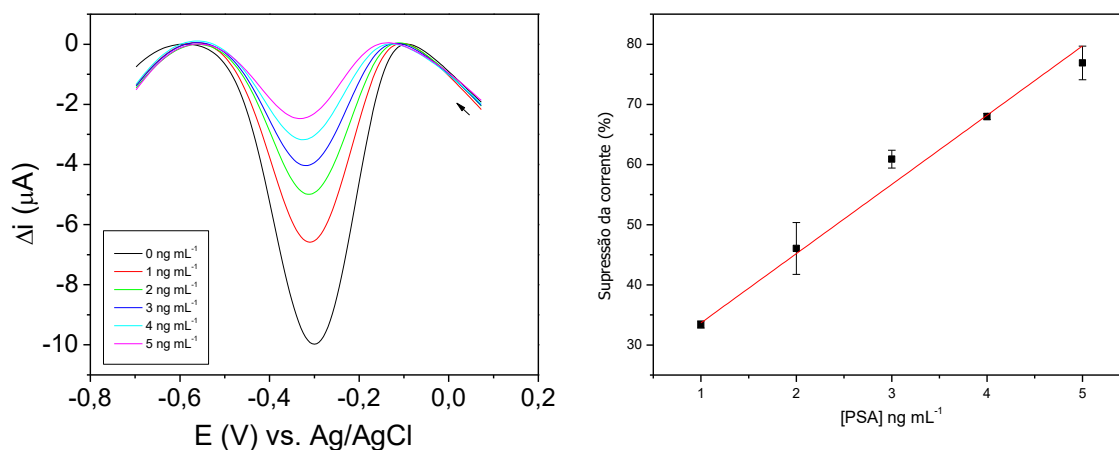
5.5.1 Curva de calibração

Para construção da curva de calibração para determinação de PSA foi utilizada a técnica de voltametria de onda quadrada com seus parâmetros otimizados. O eletrólito de suporte foi o tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4).

A Figura 9 ilustra o gráfico da curva de calibração que correlaciona a supressão da corrente com a adição de diferentes concentrações de PSA ($1 - 5 \text{ ng mL}^{-1}$) na superfície do eletrodo e os voltamogramas obtidos. A equação da regressão linear foi de: $SC = 22,17 (\pm 1,43) + 11,51 (\pm 0,46) [\text{PSA}]$, com um coeficiente de correlação (R^2) de 0,994. O limite de detecção obtido ($LOD = \text{três vezes o desvio padrão do intercepto/inclinação}$) foi de $0,37 \text{ ng mL}^{-1}$.

A linearidade da curva obtida proporciona uma boa detecção para o PSA na faixa de interesse para o diagnóstico precoce do câncer de próstata.⁹

Figura 9. Voltamogramas e curva de calibração empregando o imunossensor proposto para diferentes concentrações de PSA em tampão PBS (0,01 mol L⁻¹, pH 7,4).

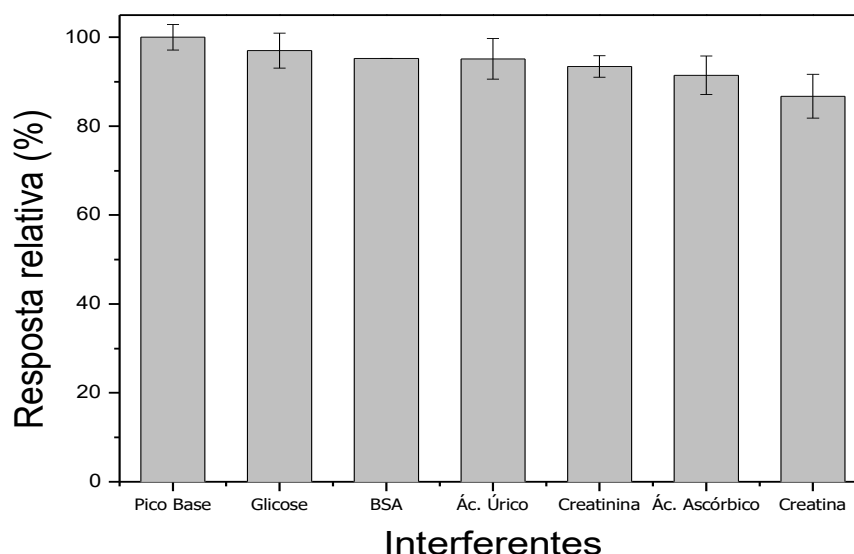


5.5.2 Estudo dos possíveis interferentes

A proposta deste trabalho foi construir um imunossensor para detecção de PSA em plasma sanguíneo, por isso foi necessário um estudo dos possíveis interferentes presentes neste meio biológico para que a determinação da concentração de PSA no sangue fosse quantificada de forma precisa.

As soluções dos possíveis interferentes foram realizadas em suas devidas concentrações²³ e utilizados em substituição a etapa de adição do antígeno. Em seguida foi realizada a medida de corrente do eletrodo contendo o possível interferente e sua resposta foi analisada, sendo que idealmente a resposta de corrente obtida deveria se manter inalterada em relação a corrente do pico base.

Como está ilustrado na Figura 10, todas as substâncias testadas apresentaram interferências menores do que 10% em relação ao pico base com exceção da creatina que apresentou uma interferência de 13%.

Figura 10. Estudo dos possíveis interferentes na resposta do imunossensor.

5.5.3 Determinação de PSA em amostras de plasma simulado

Após realizado o estudo dos interferentes, o imunossensor foi utilizado para detectar PSA (4 ng mL^{-1}) em uma amostra de plasma simulado, que consiste em uma solução contendo todos os interferentes estudados em suas respectivas concentrações²³ bem como 4 ng mL^{-1} de PSA.

O estudo foi realizado em duplicata utilizando dois eletrodos diferentes porém construídos da mesma maneira. O imunossensor proposto demonstrou uma boa capacidade de detecção, apresentando erros inferiores a 5%, como ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1. Determinação de PSA em plasma simulado.

Concentração de PSA simulado (ng mL^{-1})	PSA detectado pelo imunossensor (ng mL^{-1})	Erro (%)
4,0	$3,85 \pm 0,03$	3,84

6. Conclusão

O objetivo deste trabalho foi construir um imunossensor para determinação de PSA em plasma sanguíneo e com isso auxiliar no diagnóstico precoce do câncer de próstata de uma maneira menos invasiva ao paciente.

O imunossensor proposto apresentou uma boa sensibilidade para detecção de PSA possivelmente devido à presença das nanopartículas de ouro em sua superfície, proporcionando um microambiente biocompatível para os anticorpos, aumentando assim sua taxa de imobilização.

O imunossensor proposto apresentou bons resultados para detecção de PSA em sua faixa crítica (4 ng mL^{-1}) em plasma simulado, apresentando erros abaixo de 5% em relação à concentração real de PSA presente na amostra. Seu limite de detecção também foi satisfatório, apresentando um valor de $0,37 \text{ ng mL}^{-1}$.

Considerando os bons resultados obtidos neste trabalho, o biossensor proposto apresenta potencial de aplicação na detecção precoce da doença, aumentando a eficácia do tratamento.

5. REFERÊNCIAS

1. MOINA, C., YBARRA, G. Fundamentals and Applications of Immunosensors, **Advances in Immunoassay Technology**, ISBN: 978-953-51-0440-7, InTech, 2012.
2. FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores, **Quim. Nova**, 15, 28, 1992.
3. DEJANE, P. C. de Oliveira; RIBEIRO, F. W. P.; BECKER, H.; LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Biossensor eletroquímico baseado na enzima tirosinase para a determinação de fenol em efluentes, **Quim. Nova**, 38, 7, 924-931, 2015.
4. RICCARDI, C. S.; Costa, P. I.; YAMANAKA, H.; Imunossensor Amperométrico, **Quim. Nova**, 25, 2, 316-320, 2002.
5. MA, Z.; SHI, W. A novel label-free amperometric immunosensor for carcinoembryonic antigen based on redox membrane. **Biosensors and Bioelectronics**, 26, 6, 3068–3071, 2011.
6. KOKKINOS, C.; ECONOMOU, A.; PRODROMIDIS, M. I.; Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 79, 88–105, 2016.
7. SHARMA, A.; HONG, S.; SINGH, R.; JANG, J.; Single-walled carbon nanotube based transparent immunosensor for detection of a prostate cancer biomarker osteopontin. **Anal. Chim. Acta**, 869, 68-73, 2015.
8. LILJA, H.; ULMERT, D.; VICKERS, A. J.; Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring, **Nature Reviews Cancer**, 8, 268-278, 2008.
9. National Cancer Institute. **Prostate-Specific Antigen (PSA) Test**. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/prostate/psa-fact-sheet>>.
10. PAYNE, H.; CONFORD, P. Prostate-specific antigen: An evolving role in diagnosis, monitoring, and treatment evaluation in prostate cancer, **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, 29, 6, 593-601, 2011.

11. RAFIQUE, S.; BIN, W.; BHATTI, A. S. Electrochemical immunosensor for prostate-specific antigens using a label-free second antibody based on silica nanoparticles and polymer brush, **Bioelectrochemistry**, 101, 75-83, 2014.
12. ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. **Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications**, Academic Press, 616 pg., 277-278, 2011.
13. MERKOÇI, A. Nanoparticles Based Electroanalysis in Diagnostics Applications, **Electroanalysis**, 25, 1, 15-27, 2013.
14. LUO, X.; MORRIN, A.; KILLARD, A. J.; SMYTH, M. R. Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors, **Electroanalysis**, 18, 4, 319-326, 2006.
15. PEREIRA, F. C.; ZANONI, M. V. B.; MORETTO, L. M.; UGO, P. Características ópticas e morfológicas de nanoestruturas de ouro, **Quím. Nova**, 30, 7, 1550-1554, 2007.
16. MELO, Jr. M. A.; SANTOS, L. S. S.; GONÇALVES, M. C.; NOGUEIRA, A. F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino, **Quím. Nova**, 35, 9, 1872-1878, 2012.
17. ATKINS, P.W.; JONES, Loretta. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 3.ed. Porto Alegre: Bookman, 2006. 965 p.
18. ZAPP, E.; WESTPHAL, E.; GALLARDO, H.; SOUZA, B.; CRUZ VIEIRA I., Liquid crystal and gold nanoparticles applied to electrochemical immunosensor for cardiac biomarker, **Biosensors and Bioelectronics**, 59, 127–133, set. 2014.
19. SKOOG, A. D.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH R. S. **Fundamentos de Química Analítica**, Thomson Learning, 2006. Tradução da 8ª ed. norte americana.
20. GALLI, A.; SOUZA, D.; Garbellini, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos, **Quím. Nova**, 29, 1, 105-112, 2006.

21. SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos, **Quím. Nova**, 26, 1, 81-89, 2003.
22. SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, V. A.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações, **Quím. Nova**, 27, 5, 790-797, 2004.
23. KREBS, H.A., **Annu. Rev. Biochem.** 19, 409-430, 1950.